

猪胆汁中鹅去氧胆酸的分离纯化

章 公 大

(广州医学院生化教研室, 广州)

提 要

鹅去氧胆酸, 是 1972 年以来国内外颇受重视和致力研究的一种胆固醇胆石溶解药。为扩大材料来源和产品数量, 从猪胆汁中分离、纯化, 并对取得的纯品, 作了熔点、硅胶 G 薄层层析、红外光谱和荧光光谱等测定, 结果与西德 Dr. Falk GmbH & Co. 制品和有关文献一致。目前国内未见这方面的报道。

鹅去氧胆酸, 给胆固醇结石患者口服后, 能增加胆固醇在胆汁中的溶解度, 使胆固醇结石逐渐溶解或防止其形成。我国南方、西南和西北地区胆固醇结石并不少见^[1]。

目前, 鹅去氧胆酸主要由家禽(特别是鸡)的胆汁中直接提取^[2,4,7], 鸡、鹅等胆汁的数量有限, 难以扩大产量。猪、牛等胆汁的数量较大, 且猪胆汁中鹅去氧胆酸又较牛胆汁多^[3], 因此从猪胆汁中分离、纯化鹅去氧胆酸, 可以进一步扩大材料来源。猪胆汁中除鹅去氧胆酸(3 α , 7 α -二羟基-5 β 胆烷酸, Chenodeoxycholic acid)外, 还含有猪脱氧胆酸(3 α , 6 α -二羟基-5 β 胆烷酸, hyodeoxycholic acid), 猪胆酸(3 α , 6 α , 7 α -三羟基-5 β 胆烷酸, hyocholic acid) 和 3 α -羟基-6-氧代-5 α -胆烷酸(3 α -hydroxy-6-oxo-5 α -Cholanolic acid) 等三种胆酸, 其分离、纯化过程比较复杂。国内尚未见这方面的报道。

一、鹅去氧胆酸的分离纯化^[5,6]

鹅去氧胆酸, 分子式 $C_{24}H_{40}O_4$, 分子量 392.6, 纯品为无色无味针状结晶, 可溶于甲醇、乙醇、丙酮、冰醋酸及稀碱中, 不溶于水、石油醚及苯。在胆汁中与甘氨酸或牛磺酸结合, 多以甘氨酸胆汁酸的形式存在。具体步骤如下:

1. 猪胆汁皂化, 分离总胆酸

取新鲜猪胆收集胆汁, 按胆汁体积的 1/10 (W/V) 加入固体 NaOH, 加热迴流 24 小时, 冷却至 15℃ 时, 以 1:1 HCl 调节至 pH2, 保持温度在 10—15℃, 此时有黑色粘稠物生成, 逐渐变硬, 过滤, 收集坚硬粘稠物, 用水洗涤至洗涤液 pH 近中性。60℃ 真空干燥, 得粗总胆酸。

2. 胆酸酯化和猪脱氧胆酸甲酯的分离

取总胆酸固体, 溶于热水中, 近 50℃ 左右时, 加入 4 倍量 (V/W) 的醋酸乙酯, 用稀 H_2SO_4 调节混合液至呈弱酸性, 振摇 30 分钟后使分层, 下水层分离弃去, 上层醋酸乙酯有机相中加入活性炭, 振摇 30 分钟, 过滤, 滤渣用少量醋酸乙酯洗涤数次, 滤液与洗液合并, 蒸发至干。将残渣溶于甲醇, 加入浓硫酸酯化, 在室温下时时振摇, 一夜之后, 用碳酸氢钠中和至 pH 7, 混合物过滤并蒸发至干。残渣溶于苯中, 滤液浓缩至原容积的一半时, 冰箱中放置过夜。粘稠物滤过, 滤饼(猪脱氧胆酸甲酯-苯加合物)用苯少许洗涤后弃去, 洗液与滤液合并。

3. 胆酸酯乙酰化, 和 3 α -乙酰氧基-6-氧代-5 α -胆烷酸甲酯、三乙酸猪胆酸甲酯的分离

将苯滤液和洗液称重并蒸发至干, 残渣中加入等量的醋酐和少量的无水醋酸钠, 混合物

回流 5 小时。蒸馏除去一定量的醋酐后, 5℃放置 10—20 小时, 过滤, 滤饼(3 α -乙酰氧基-6-氧代-5 α -胆烷酸甲酯)用冷醋酐洗涤。

将滤液和洗液合并, 蒸馏除去过剩的醋酐, 残渣中加入一定数量的甲醇, 回流 15 分钟, 然后蒸发至干, 除去残存的醋酐。再将残渣溶于己烷中, 加热回流 10 分钟, 冷却至室温, 并于室温(20℃)振摇 3 小时, 放置过夜。粘稠物过滤, 滤饼(三乙酸猪胆酸甲酯)用少量己烷洗涤, 洗液与滤液合并。

4. 二乙酸鹅去氧胆酸甲酯的分离

将合并的滤液与洗液蒸发至干, 残渣溶于热乙醇中, 溶液冷却并于冰箱中放置过夜。粘稠物滤过。滤饼用冷乙醇洗涤, 并将洗液与滤液合并, 于 60℃ 真空干燥, 即得二乙酸鹅去氧胆酸甲酯粗品。用 3—4 倍体积的乙醇重结晶一次。

5. 鹅去氧胆酸甲酯的皂化和鹅去氧胆酸的提取

取二乙酸鹅去氧胆酸甲酯, 加入等量 NaOH 的水溶液中, 回流 14 小时后, 用一倍量的水稀释, 溶液用 H₂SO₄ 中和至接近 pH5, 用醋酸乙酯抽提, 水层弃去。醋酸乙酯抽提液用 NaCl 水溶液洗涤后, 接着用水洗涤, 然后蒸发至接近总容积的 1/3 时, 放冷, 加入等量己烷, 置冰箱中 10—20 小时。粘稠物滤过。滤饼用己烷少许洗涤后, 60℃ 真空干燥或晾干, 得鹅去氧胆酸。

6. 鹅去氧胆酸的进一步纯化

将鹅去氧胆酸, 混悬于 2—3 倍量的水中, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 10 左右, 将溶液温热至约 50℃, 用一定量的醋酸乙酯分次抽提, 直至取抽提液用硅胶 G 薄层层析检测, 与标准物质所示的斑点一致时止。

将上述鹅去氧胆酸的钠盐溶液, 在硅藻土上滤过, 加入鹅去氧胆酸 10 倍量(V/W)的醋酸乙酯, 逐滴加入 4N HCl, 边加边摇, 直至水层中不再出现白色混浊, 振摇 15 分钟, 分去水层, 醋酸乙酯相用少许水洗涤两次, 加入活性炭室温振摇后过滤, 滤液浓缩至油状粘稠液。当冷

却至室温时用一定量的水覆盖液面, 慢慢加热至 60℃, 当醋酸乙酯和水先后逸出, 余下两倍量的水时, 可获得结晶, 滤过, 80℃ 通气干燥。

二、质量检测

1. 熔点测定

用微量熔点测定仪(温度计未校正)测定, 提取纯品的熔点, 与西德 Dr. Falk GmbH & Co. 生产胶囊(每丸含 250 毫克鹅去氧胆酸), 经用甲醇抽提分离赋形剂后所得纯品的熔点, 均在 136—140℃ 之间, 与文献[4]报道一致(但亦有报道为 119℃、141℃ 或 143℃^[7])。

2. 薄层层析

按常法取硅胶 G 加适量蒸馏水调匀, 用涂布器在玻板上铺成薄层板, 干燥活化后, 在距薄层板一端约 1.5 厘米处, 点上检样的甲醇溶液(浓度为每 1 微升含 1 微克), 然后用 80:20(V/V)的苯: 冰醋酸或 85:5:10(V/V)氯仿: 甲醇: 冰醋酸展开剂, 在密闭的层析缸中展开, 以茴香醛试剂(茴香醛 0.5 毫升, 浓硫酸 1 毫升, 冰醋酸 50 毫升)喷雾显色, 在 125℃ 加热 10 分钟后, 在紫外灯下观察色斑, 结果提取纯品与西德 Dr. Falk GmbH & Co. 产品, 两者斑点的位置基本一致(图 1)。

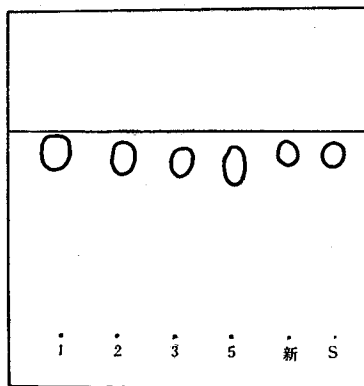


图 1 1、2、3、5 分别为分离样品; 新、S 分别为西德对照标准。

3. 红外光谱测定

分离样品用日立 285 光栅型红外分光光度计测出的红外吸收光谱(图 2), 与文献[7]所示

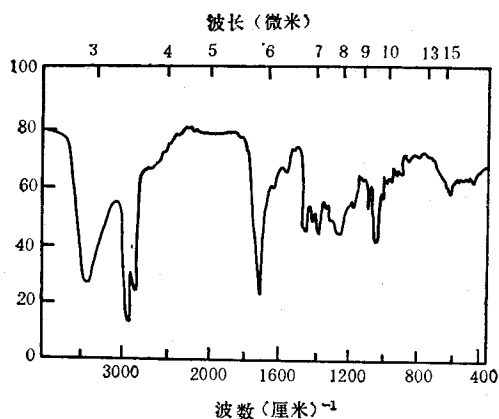


图2 分离样品的红外光谱

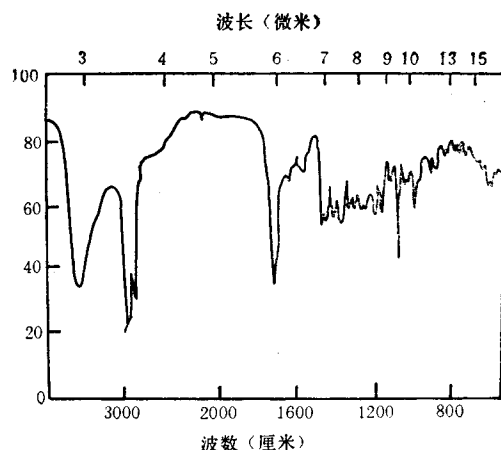


图4 西德产品的红外光谱

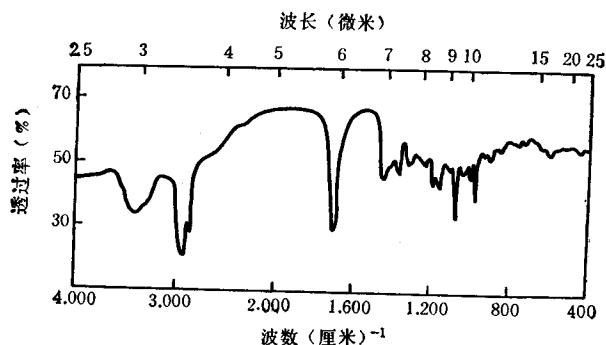


图3 文献[7]所示的鹅去氧胆酸红外光谱(溴化钾片)

的鹅去氧胆酸红外光谱(图3),和西德 Dr. Falk GmbH & Co. 产品的红外光谱(图4),均基本吻合。

4. 荧光光谱^[8]测定

称取分离样品与标准(西德Dr. Falk GmbH & Co. 胶囊分离赋形剂后的)样品各400微克,加入5毫升浓 H_2SO_4 (分析纯),将试管于

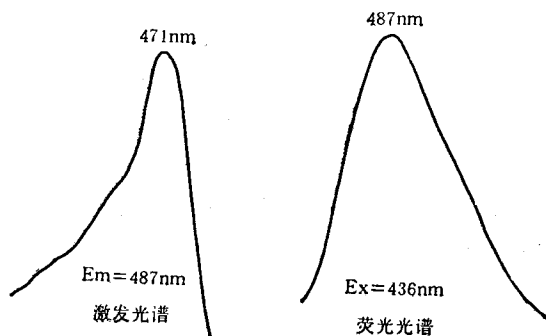


图5 分离样品的荧光光谱

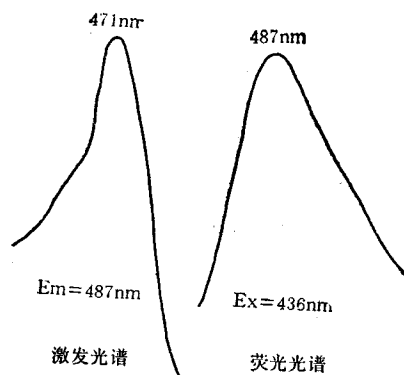


图6 标准的荧光光谱

$65^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ 水浴加热60分钟。立即振摇使溶,冷却后,用浓 H_2SO_4 稀释至每毫升含样品20微克,在日立MPF-4型荧光光度计中测定。在相同条件下与标准品对照,测得激发光谱的顶峰为471nm,在激发光源为436nm时测得荧光发

射光谱的顶峰在 487 nm。分离样品的激发光谱图与荧光发射光谱图的形状及顶峰波长位置(图5),均与对照标准品相同(图6)。

三、讨 论

1. 鹅去氧胆酸由猪胆汁中分离、纯化,可扩大材料来源和产品数量,虽分离、纯化过程较复杂,使用有机溶剂亦较多,但如连续大量提取,则多数可以蒸馏,回收再用。

2. 硅胶 G 薄层层析,设备简单,操作容易、快速、灵敏度高,借以检测分离、纯化程度,是一个极为实用和不可缺少的手段。

3. 从猪胆汁分离、纯化鹅去氧胆酸,为猪胆汁的综合利用,增辟了一个新的内容。副产物猪脱氧胆酸甲酯,纯化为猪脱氧胆酸,可作降血脂药,降低血中胆固醇,用于高脂血症;也是人工牛黄配方中的重要原料^[4]。治疗气管炎(祛痰作用),均有满意的疗效。

4. 鹅去氧胆酸口服除用作胆固醇结石溶解药外,亦可用来减少偏头痛(migraine)病人的发作频率,250 毫克每日三次^[9]。

5. 鹅去氧胆酸作溶胆石药,常见的副作用是^[1]腹泻、肝损害(血清柠檬酸脱氢酶和转氨酶轻度升高)。亦有人认为有促发结肠癌的作用。但据陈崇宏、徐叔云最近的综合报道^[10],认为在

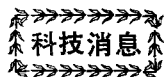
二年的治疗时间内,鹅去氧胆酸并不会造成病人肝脏的损害,并指出一般病人以采用 14—15 毫克/公斤/日较合适。还提及 Silverman 等采用鼠伤寒杆菌、枯草杆菌分离的诱变菌株在哺乳动物微粒体上实验,无论是鹅去氧胆酸或熊去氧胆酸均未见有诱变作用,故认为有诱发结肠癌危险的说法应作进一步研究。

红外光谱由广州市药品检验所邓兆勇药师代测;荧光光谱由本院中心实验室李瑞骥副教授代测,一并致谢!

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院等:《医用生物化学》(上册),人民卫生出版社,269,1979。
- [2] Saltzman, W. H.: *U.S. Patent*, 3919266, 1975。
- [3] 宇治昭:《生药学杂志》29(1), 22, 1975。
- [4] 商业部脏器生化制药情报中心站:《动物生化制药学》人民卫生出版社,259,340,1981。
- [5] Gerhard, Lehmann et al.: *Biochem. Z* 341(4), 430, 1965。
- [6] Gerhard Lehmann et al.: *Biochem. Z* 340(1), 75 1964。
- [7] 江苏泰州市生物制药厂等:《生物化学与生物物理进展》,2, 25, 1975。
- [8] Levin, Sz et al.: *Anal. Chem.*, 33 (7), 856, 1961。
- [9] Levig, V. G. et al.: *Med. Chir. Dig.*, 8(3), 248, 1979。
- [10] 陈崇宏、徐叔云:《临床肝胆病杂志》,1(1),20,1985。

[本文于 1986 年 12 月 9 日收到]



国产高比活度 [³⁵S]dATPαS

1983 年我们在 DNA 顺序测定中使用的缓冲梯度和 [³⁵S] dATPαS 系统(请见 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1983)80, 3963—3965) 现在已被国际上广泛采用。

在中国科学院和上海分院领导的支持下,经过中科院上海原子核所和上海生化所同志们一年多的辛勤努力,符合国际标准的 [³⁵S]dATPαS 已经试制出来了。不久前它通过了中国科学院的鉴定。我们使用了多批国产的 [³⁵S]dATPαS 都获得了满意的结果。

在酶法 DNA 顺序测定中, [³⁵S]dATPαS 比 [³²P] dATP 具有分辨率高而放射危害低等优点,它同时也可以被用作缺口移位(Nick translation)。如果在国内运输上能很好配合,那么这个国产的在分子生物学和遗传工程研究中至关重要的标记化合物将可在一切有条件的部门和单位顺利地地使用,这将对我国的生命科学研究有所促进。

【中国科学院上海生化所 洪国藩】